

副腎髄質カテコールアミン遊離におけるカリウムチャンネル及び一酸化窒素の役割

著者	永山 貴弘
号	268
発行年	1999
URL	http://hdl.handle.net/10097/15446

氏 名 (本籍)	なが 永	やま 山	たか 貴	ひろ 弘
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)			
学 位 記 番 号	薬 博 第 2 6 8 号			
学位授与年月日	平 成 12 年 3 月 23 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専門課程	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 薬学専攻			
学 位 論 文 題 目	副腎髄質カテコールアミン遊離におけるカリウム チャンネル及び一酸化窒素の役割			

	(主 査)	
論文審査委員	教授 佐 藤 進	教授 大 内 和 雄
		教授 大 泉 康

論文内容要旨

副腎髄質は交感神経節前線維の支配を受けており、神経終末より放出されるアセチルコリンは髄質細胞膜上のニコチン受容体を活性化し、膜電位の脱分極とともに電位依存性カルシウムチャネルを開口させ、細胞内へのカルシウムイオン流入を惹起し、カテコールアミンを分泌させる。脱分極はカリウムチャネルを通るカリウムイオンの細胞外流出により静止電位まで戻される。副腎髄質クロマフィン細胞にカルシウム活性化カリウムチャネルなどの様々なタイプのカリウムチャネルが存在し、カテコールアミン遊離を修飾することが示唆されているが、生理的条件下のカテコールアミン遊離におけるカリウムチャネルの役割は明らかにされていない。また、カルシウム活性化カリウムチャネルは、細胞内遊離カルシウムイオンにより活性化されることから、細胞内へのカルシウムイオン流入に寄与する電位依存性カルシウムチャネルのカテコールアミン遊離における役割を検討することは、カルシウム活性化カリウムチャネルの活性化経路を明確にする上で重要である。さらに、カルシウム活性化カリウムチャネルの1つである BK_{Ca} チャネルの開口は、内皮由来弛緩因子である一酸化窒素 (NO) により修飾されることが報告されており、NO のカテコールアミン遊離修飾作用に BK_{Ca} チャネルが関与している可能性が考えられる。以上の観点から、麻酔下イヌ生体位副腎標本を用いて、大内臓神経刺激、アセチルコリン、選択的ニコチン受容体作動薬 1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium (DMPP)、選択的ムスカリン受容体作動薬ムスカリンによるカテコールアミン遊離に対するカリウムチャネル遮断薬、電位依存性カルシウムチャネル遮断薬及び NO 関連薬の作用、並びに NO ドナーと BK_{Ca} チャネル遮断薬の相互作用を検討した。

1. カリウムチャネルの役割

大内臓神経刺激 (1, 2 及び 3 Hz) あるいはアセチルコリン (0.75, 1.5 及び 3 μ g), DMPP (0.1, 0.2 及び 0.4 μ g), ムスカリン (0.5, 1 及び 2 μ g) の副腎動脈内投与により、エピネフリン及びノルエピネフリン流出量は頻度依存的あるいは用量依存的に増加した。 SK_{Ca} チャネル遮断薬アパミン (1, 3 及び 10 ng/min) あるいはシラトキン (10, 30 及び 100 ng/min) の副腎動脈内持続投与は、アセチルコリン, DMPP, ムスカリンによるカテコールアミン流出量増加反応を用量依存的に増強したが、大内臓神経刺激による流出反応に対しては影響を及ぼさなかった。 BK_{Ca} チャネル遮断薬チャリブドトキシシン (10, 30 及び 100 ng/min) は、大内臓神経刺激、アセチルコリン, DMPP, ムスカリンによるカテコールアミン流出反応に対して影響を及ぼさなかった。 K_A チャネル遮断薬 mast cell degranulating (MCD) peptide (10, 30 及び 100 ng/min) は、大内臓神経刺激によるカテコールアミン流出反応を用量依存的に増強したが、アセチルコリン, DMPP, ムスカリンによる流出反応に対しては影響を及ぼさなかった。以上の結果より、 SK_{Ca} チャネルはニコチン受容体とムスカリン受容体を介するカテコールアミン遊離のいずれをも抑制的に制御していることが示唆された。 SK_{Ca} チャネル遮断薬が外因性アセチルコリンによるカテコールアミン遊離作用を増強するにもかかわらず内因性アセチルコリンによるカテコールアミン遊離作用に対して影響を及ぼさないことは、 SK_{Ca} チャネルが髄質細胞のシナプス外に局在してもシナプス内には存在しない可能

性を示唆している。チャリブドトキシンはいずれの刺激によるカテコールアミン遊離に対しても作用を示さず、カテコールアミン遊離機構における BK_{Ca} チャンネルの関与は認められなかった。内因性アセチルコリンによるカテコールアミン遊離に対する MCD peptide の選択的増強作用は、節前神経終末からのアセチルコリン遊離を増強する結果によるものと推察され、節前神経終末にアセチルコリン遊離を抑制的に制御する K_A チャンネルの存在が示唆された。

2. 電位依存性カルシウムチャンネルの役割

電位依存性 L 型及び N 型カルシウムチャンネル遮断薬シルニジピン (0.3, 1 及び 3 $\mu\text{g}/\text{min}$) は、大内臓神経刺激、アセチルコリン、DMPP によるエピネフリン及びノルエピネフリン流出反応を抑制した。また、シルニジピンは、ムスカリンによるノルエピネフリン流出反応を抑制したが、エピネフリン流出反応には影響を及ぼさなかった。電位依存性 L 型カルシウムチャンネル遮断薬ニフェジピン (0.3, 1 及び 3 $\mu\text{g}/\text{min}$) は、アセチルコリン、DMPP によるエピネフリン及びノルエピネフリン流出反応を抑制したが、大内臓神経刺激、ムスカリンによる流出反応には影響を及ぼさなかった。内因性と外因性アセチルコリンによるカテコールアミン遊離作用に対するニフェジピンの異なる効果は、電位依存性 L 型カルシウムチャンネルが髄質細胞のシナプス外に局在している可能性を示唆している。以上の結果から、電位依存性 L 型カルシウムチャンネルがニコチン受容体を介するエピネフリン及びノルエピネフリン遊離に関与しているが、ムスカリン受容体を介する遊離には関与していないこと、さらに、電位依存性 N 型カルシウムチャンネルは、ニコチン受容体を介するエピネフリン及びノルエピネフリン遊離、ムスカリン受容体を介するノルエピネフリン遊離に関与しているが、ムスカリン受容体を介するエピネフリン遊離には関与していないことが示唆された。これらの結果を踏まえると、 SK_{Ca} チャンネルの活性化経路は以下のように推察される。ニコチン受容体の活性化は電位依存性 L 型及び N 型カルシウムチャンネルの活性化を引き起こし、これらのチャンネルを介したカルシウムイオン流入がエピネフリン及びノルエピネフリンを遊離させると同時に、 SK_{Ca} チャンネルを活性化する。ムスカリン受容体を介するノルエピネフリン遊離における SK_{Ca} チャンネルの寄与もニコチン受容体を介する遊離と同様に説明される。すなわち、電位依存性 N 型カルシウムチャンネルを介するカルシウムイオン流入が SK_{Ca} チャンネルを活性化すると思われる。一方、エピネフリン分泌細胞におけるムスカリン受容体の活性化は、細胞内貯蔵部位からのカルシウムイオン放出を起こし、エピネフリンを遊離させると同時に SK_{Ca} チャンネルを活性化すると考えられる。

3. NO の役割

NO 合成酵素阻害薬 N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 0.1 mg/min) は、大内臓神経刺激によるカテコールアミン流出反応に影響を及ぼさなかったが、アセチルコリンによる流出反応を増強した。この結果から、内因性 NO が副腎髄質からのカテコールアミン遊離を抑制していること、さらには内因性 NO が節前神経終末からのアセチルコリン遊離を促進している可能性が示唆された。自発性 NO ドナー NOC 7 (0.2, 0.6 及び 2 $\mu\text{g}/\text{min}$) はアセチルコリンによるカテコールアミン流出反応を抑制した。

この結果は、内因性 NO による抑制効果に加えて、NOC 7 由来 NO のさらなるカテコールアミン遊離抑制作用が発現したことを示している。大内臓神経刺激によるカテコールアミン流出反応は NOC 7 で抑制され、アセチルコリン遊離に対する NO の促進作用を示唆する結果は得られなかった。内因性 NO のアセチルコリン遊離促進作用がすでに最大限に発現されているため、NOC 7 由来 NO の作用が発揮し得なかったと考えられる。L-NAME (1 mg/min) 存在下に、NOC 7 (2 μ g/min) はアセチルコリンによるカテコールアミン流出反応を抑制したが、大内臓神経刺激による流出反応には影響を及ぼさなかった。この結果は、L-NAME 処置により内因性 NO が減少している状態で、NOC 7 由来 NO が節前神経終末からのアセチルコリン遊離を促進する一方、髄質細胞からのカテコールアミン遊離を抑制することを示している。以上の結果より、NO がカテコールアミン遊離を抑制的に修飾していること、NO が副腎髄質を支配する節前神経終末からのアセチルコリン遊離を促進的に修飾している可能性が示唆された。

4. NO と BK_{Ca} チャネルの連関

NOC 7 (2 μ g/min) 単独投与は、大内臓神経刺激によるカテコールアミン流出反応を抑制したが、NOC 7 (2 μ g/min) チャリブドトキシン (100 ng/min) の併用は流出反応に影響を及ぼさなかった。この結果は、チャリブドトキシンが NOC 7 のカテコールアミン遊離抑制作用を遮断したことを示しており、大内臓神経刺激によるカテコールアミン遊離に対する NO の抑制効果に BK_{Ca} チャネルが関与していることを示唆している。一方、アセチルコリンによるカテコールアミン流出反応は、NOC 7 単独投与時と同様に、NOC 7 とチャリブドトキシンの併用で抑制された。従って、アセチルコリンによるカテコールアミン遊離に対する NO の抑制効果には BK_{Ca} チャネルは関与していないと思われる。

本研究から、(1) K_A チャネルは副腎髄質を支配する交感神経節前線維からのアセチルコリン遊離に対して抑制的役割を担っていること、(2) SK_{Ca} チャネルは副腎髄質からのニコチン及びムスカリン受容体を介するカテコールアミン遊離を抑制的に制御していること、(3) 交感神経節前線維の活性上昇によるカテコールアミン遊離に対する NO の抑制作用には BK_{Ca} チャネルが関与していることが示唆された。

審査結果の要旨

生体内で最も多量のカテコールアミン(CA)を含有している臓器は副腎髄質クロマフィン細胞であり、エピネフリン (EPI)・ノルエピネフリン (NE) などの CA を分泌している。この遊離機構は交感神経節前線維の神経終末から分泌されたアセチルコリン (ACh) によって制御されるが、その機構については培養細胞等を用いた研究のみで、生理的条件下の解析はほとんど報告されていない。本研究は、麻酔下イヌ生体位副腎標本を用いて、副腎髄質からの CA 遊離機構におけるカリウム (K) チャネル、電位依存性カルシウム (Ca) チャネルおよび一酸化窒素 (NO) の役割、ならびに NO と Ca 活性化 K チャネルである BK_{Ca} チャネルの連関について検討し、以下の多くの新しい知見を提示した。

1) SK_{Ca} チャネル遮断薬は ACh, DMPP, ムスカリンによる CA 遊離増加反応を用量依存的に抑制し、大内臓神経刺激 CA 遊離増加反応に影響しなかったことから、 SK_{Ca} チャネルはシナプス外に存在し、ニコチンおよびムスカリン受容体を介する CA 遊離を抑制的に制御していることを明らかにした。他方、 BK_{Ca} チャネル遮断薬が各刺激による CA 遊離増加反応に影響しなかったことから、 BK_{Ca} チャネルは CA 遊離に関与していないことを示した。

2) K_A チャネル遮断薬は大内臓神経刺激による CA 遊離のみ用量依存的に制御したことから、 K_A チャネルは副腎髄質を支配する交感神経節後線維からの ACh 遊離を抑制的に制御していることを明らかにした。

3) 電位依存性 L 型 Ca チャネルは、ニコチン受容体を介する EPI および NE 遊離に関与しているが、ムスカリン受容体を介する遊離には関与していないこと、電位依存性 N 型 Ca チャネルは、ニコチン受容体を介する EPI および NE 遊離ならびにムスカリン受容体を介する NE 遊離に関与しているが、ムスカリン受容体を介する EPI 遊離には関与していないことを示した。従って、 SK_{Ca} チャネルの活性化経路は、ニコチン受容体の活性化による電位依存性 L 型および N 型 Ca チャネルの活性化を経て CA 遊離増加を招来すること、ムスカリン受容体の活性化により電位依存性 N 型 Ca チャネルの活性化を誘起することを示唆した。

4) NO は、副腎髄質を支配する交感神経節前線維からの ACh 遊離を促進し、シナプス内 BK_{Ca} チャネルの活性化を介して髄質細胞からの EPI および NE 遊離を抑制することを明らかにした。

以上、副腎における CA 遊離機構に関する薬理学的解析から提示されたいくつかの知見は、化学伝達物質の分泌機構に普遍化し得る内容を含み、同時に循環薬理学研究分野においても非常に有用な情報を提供したものである。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として認める。